

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 752 475 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
08.01.1997 Bulletin 1997/02

(51) Int Cl.⁶: **C12N 15/55, C12N 9/16,
C12N 1/21, C12N 15/10**

(21) Numéro de dépôt: **96401419.5**

(22) Date de dépôt: **27.06.1996**

(84) Etats contractants désignés:
AT CH DE FR GB IT LI SE

(30) Priorité: **29.06.1995 FR 9507833**

(71) Demandeur: **COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE
75015 Paris (FR)**

(72) Inventeurs:
• **Boulain, Jean-Claude
91120 Palaiseau (FR)**

• **Cattolico, Laurence
92330 Sceaux (FR)**
• **Ducancel, Frédéric
91160 Longjumeau (FR)**
• **Menez, André
78114 Magny les Hameaux (FR)**

(74) Mandataire: **Orès, Bernard et al
Cabinet ORES
6, Avenue de Messine
75008 Paris (FR)**

(54) **Phosphatases alcalines bactériennes modifiées et leurs applications**

(57) Phosphatases alcalines modifiées d'origine bactérienne (BAP ou *Bacterial Alkaline Phosphatase*) constituées par une séquence de phosphatase alcaline bactérienne, dans laquelle au moins l'un des résidus d'acide-amino en position 329 ou en position 330 est substitué par un autre résidu d'acide-amino, lesquelles phosphatases alcalines bactériennes modifiées pré-

sentent à la fois des propriétés enzymatiques significativement améliorées et une stabilité thermique élevée, et leurs applications notamment dans les dosages immuno-enzymatiques (réactifs et kits de diagnostic).

Procédé de sélection de mutants de phosphatases alcalines ayant des propriétés enzymatiques significativement améliorées.

EP 0 752 475 A1

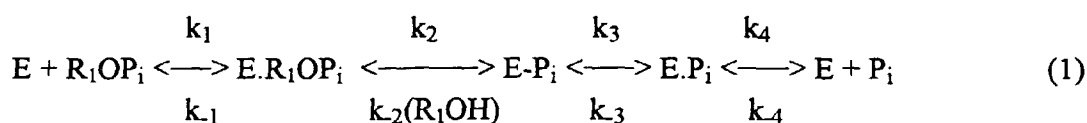
Description

La présente invention est relative à des phosphatases alcalines bactériennes (BAP ou *Bacterial Alkaline Phosphatase*) modifiées présentant à la fois des propriétés enzymatiques significativement améliorées et une stabilité thermique élevée, et à leurs applications notamment dans les dosages immuno-enzymatiques (réactifs et kits de diagnostic).

La présente invention est également relative à un procédé d'obtention de mutants ayant des propriétés enzymatiques significativement améliorées.

La phosphatase alcaline est une phosphomonoestérase non spécifique. Cette métalloenzyme dimérique comprend deux chaînes polypeptidiques identiques contenant chacune deux atomes de zinc et un atome de magnésium, situés au coeur du site catalytique.

Le mécanisme catalytique comprend plusieurs étapes dont la formation d'un complexe intermédiaire covalent phosphoryl-enzyme (E-P_i) avec la sérine 102 de la protéine, conformément à la réaction suivante :



La constante catalytique de la réaction (k_{cat}) dépend de l'étape limitante du processus. A pH acide, le facteur limitant est la rupture de la liaison covalente E-P_i ; à pH alcalin, c'est la dissociation du complexe non-covalent E.P_i qui est l'étape limitante (BUTLER-RANSOHOFF et al., J. Org. Chem., 1992, 57, 142-145).

En présence d'un accepteur de phosphate (R₂OH), tel que l'éthanolamine ou le Tris, l'enzyme catalyse une réaction de transphosphorylation avec le transfert du groupe phosphoryl à l'alcool, conformément à la formule (2) ci-après :



L'efficacité catalytique est appréciée par le rapport k_{cat}/K_M , qui tient compte à la fois de l'activité hydrolytique et de l'affinité pour le substrat, de l'enzyme.

On trouve la phosphatase alcaline chez tous les organismes, des bactéries aux mammifères.

Les enzymes présentes chez les mammifères possèdent les activités spécifiques les plus élevées, c'est pourquoi la phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP = *Calf Intestine Phosphatase*) est habituellement choisie pour construire les réactifs immuno-enzymatiques, utilisés dans les tests de diagnostic *in vitro*. La CIP est cependant difficile à purifier de façon reproductible et présente une faible stabilité thermique.

La phosphatase alcaline bactérienne (BAP), qui présente une activité enzymatique significativement inférieure à celle de la CIP, est produite en grande quantité par *E. coli* ; elle peut être purifiée aisément et possède une stabilité thermique exceptionnelle. En outre, elle peut être utilisée pour la construction de réactifs immuno-enzymatiques par des techniques de fusion génétique.

Différentes équipes ont, en conséquence, tenté d'améliorer les propriétés catalytiques de l'enzyme bactérienne, afin de la substituer à la CIP dans la fabrication des réactifs de dosage.

L'introduction de mutations ponctuelles dans le site actif de la BAP a permis d'obtenir des molécules possédant une activité enzymatique augmentée par rapport à l'enzyme de type sauvage :

CHADAROGLOU et KANTROWITZ (*Protein Engineering*, 1989, 3, 2, 127-132) ont décrit un mutant de la BAP d'*E. coli*, dans lequel l'acide aspartique en position 101 est remplacé par de l'alanine (mutant dénommé D101A). Un tel mutant présente, à pH 9,4 et en présence d'accepteur de phosphate, une activité catalytique trois fois supérieure à celle de l'enzyme de type sauvage, mais une nette diminution de la stabilité à la chaleur.

Les études de stabilité thermique ont été réalisées dans des conditions différentes de celles communément admises ; toutefois, elles montrent clairement que le mutant a une stabilité thermique inférieure à celle de l'enzyme sauvage.

La Demande de Brevet européen 0441252, au nom de Abbott Laboratories, décrit des phosphatases alcalines ayant une activité spécifique améliorée (activité catalytique trente six fois supérieure à celle de l'enzyme de type sauvage), à pH 10, en présence de faibles concentrations soit de Tris 0,05 M, soit de diéthanoline 0,05 M, mais qui présentent une stabilité thermique diminuée, en vue de leur utilisation comme réactifs. Les mutations décrites dans

cette Demande se situent soit à une distance d'environ 20 Å du site actif de l'enzyme, soit à une distance d'environ 10 Å du site actif de l'enzyme, soit dans le site actif et incluent :

(i) les mutations ne concernant qu'un seul amino-acide, telles que :

- la substitution de Thr¹⁰⁰ par Val ou Ile (mutants T100V ou T100I)
- la substitution de Lys³²⁸ par Arg (mutant L328R)
- la substitution de Val⁹⁹ par Ala, (mutant V99A)
- la substitution de Ala¹⁰³ par Asp ou Cys (mutants A103D ou A103C)
- la substitution de Thr¹⁰⁷ par Val (mutant T107V)
- la substitution de Asp¹⁰¹ par Ser (mutant D101S)

(ii) les mutations faisant intervenir deux amino-acides, telles que :

- la substitution de Val⁹⁹ par Ala et de Lys³²⁸ par Arg (mutant V99A et K328R)
- la substitution de Val³⁷⁷ par Ala et de Ser⁴¹⁵ par Gly (mutant V377A et S415G).

La Demande Internationale PCT WO 94/01531, également au nom de Abbott Laboratories et qui reprend en substance le contenu de la Demande européenne précitée, décrit en outre la substitution de Asp¹⁵³ par Gly (mutant D153G).

De manière générale, pour mesurer une activité catalytique, il est nécessaire de se placer pour une enzyme donnée, dans les conditions optimales de son activité ; or, dans ces Demandes Abbott, l'activité de l'enzyme sauvage et des mutants est comparée dans les mêmes conditions, en l'occurrence dans les conditions optimales des mutants.

En conséquence, dans le cas des Demandes Abbott, l'augmentation de l'activité catalytique d'un facteur 36, résulte de la comparaison de l'activité catalytique du mutant placé dans les conditions optimales de fonctionnement, avec l'activité catalytique de l'enzyme sauvage dans les mêmes conditions. Si l'on compare ces activités dans les conditions optimales de fonctionnement de chacune des enzymes, le facteur d'accroissement des propriétés catalytiques se limite à 18.

En outre, aucun de ces mutants (qui diffèrent de la BAP de type sauvage par seulement un ou deux résidus au plus) ne parvient à procurer à la phosphatase alcaline modifiée à la fois une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme de mammifère correspondante et une stabilité thermique significativement supérieure à celle de l'enzyme de mammifère et notamment la stabilité thermique de l'enzyme bactérienne de départ.

D'autres travaux ont été réalisés, dont l'objectif était de mieux comprendre le mécanisme catalytique de l'enzyme. Plus précisément, les Auteurs de ces différents articles se sont attachés à déterminer les causes moléculaires à l'origine des différences observées entre la BAP et les enzymes de mammifères : activité enzymatique 20 à 30 fois plus élevée des enzymes de mammifères, déplacement de l'activité optimale vers les pH élevés, addition de magnésium nécessaire à l'obtention d'une activité maximale. Dans la région du site actif, il existe deux différences notables entre les enzymes bactériennes et les enzymes de mammifères. Dans les enzymes bactériennes, les positions 153 et 328 sont occupées par les résidus Asp et Lys respectivement, tandis qu'un résidu His est présent à ces deux positions dans les enzymes de mammifères. Afin d'évaluer l'importance de ces différences sur l'activité enzymatique, des résidus His ont été introduit sur ces deux positions dans l'enzyme bactérienne (XU et KANTROWITZ, Biochemistry, 1991, **30**, 7789-7796; JANEWAY et al., Biochemistry, 1993, **32**, 1601-1609).

XU et KANTROWITZ décrivent en particulier la substitution de la lysine en position 328, par une histidine, et les propriétés du mutant obtenu (K328H). En présence d'un accepteur de phosphate, le mutant K328H a une activité comparable à celle de l'enzyme sauvage; par contre, à pH 8 et en l'absence d'accepteur de phosphate, ce mutant présente une diminution significative de l'activité catalytique, comparée à celle de l'enzyme sauvage. Ces résultats suggèrent que ces mutations entraînent une inhibition de l'activité hydrolytique, accompagnée d'une augmentation de l'activité de transphosphorylation. En outre, ce mutant a une affinité réduite pour le phosphate. En résumé, une telle mutation entraîne : - un déplacement de l'activité enzymatique optimale vers pH 10, - une augmentation de l'activité spécifique (surtout activité transférase) et - une baisse d'affinité pour le substrat et pour le phosphate inorganique P_i, à pH 10.

Cette baisse d'affinité pour P_i est sans doute liée à la suppression de la liaison au P_i par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, qui accélère l'étape limitante de la libération du P_i par l'enzyme.

MATLIN et al. (Biochemistry, 1992, **31**, 8196-8200) ont étudié d'autres mutations au niveau de la position 153 de la phosphatase alcaline d'*E. coli* (remplacement de l'acide aspartique par de l'alanine: D153A ou par de l'asparagine : D153N) et ont également montré que la présence de magnésium est indispensable à l'activité de ces mutants. En outre, alors que le mutant D153N présente des paramètres cinétiques similaires à ceux de l'enzyme sauvage, le mutant D153A entraîne une augmentation d'un facteur 6,3 du k_{cat}, une augmentation d'un facteur 13,7 du rapport k_{cat}/K_M (Tris 50 mM, pH 8) et une augmentation d'un facteur 159 du K_i pour le P_i (Tris 1 M, pH 8). De plus l'activité de ce mutant

augmente d'un facteur 25, lorsque le pH est augmenté de 7 à 9.

L'importance de la présence de magnésium pour avoir effectivement une activité catalytique, tant pour le mutant D153A que pour un mutant D153H a été mise en évidence par MURPHY et al. (J. Biol. Chem., 1993, **268**, 29, 21497-21500), qui montrent que la mutation D153H entraîne la conversion du site de liaison au magnésium en un site de liaison au zinc.

JANEWAY et al. ont également exploré le rôle des résidus en position 153 et 328, de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. Les mutants D153H (remplacement de l'acide aspartique en position 153 par une histidine), K328H (remplacement de la lysine en position 328 par une histidine) et D153H/K328H ont été plus particulièrement étudiés ainsi que les interactions, au niveau du site actif de la phosphatase alcaline, faisant intervenir de l'eau.

Il ressort de cet article que :

- le mutant D153H présente un déplacement de l'activité enzymatique optimale vers pH 10 et une baisse d'affinité pour le magnésium ; en présence de magnésium additionnel, l'activité catalytique est restaurée et est même supérieure à celle de l'enzyme sauvage.

Cette modification d'activité est sans doute due au fait que D153, dans l'enzyme sauvage, lie le magnésium par l'intermédiaire de deux molécules d'eau ; sa suppression déstabilise le magnésium qui est remplacé par un zinc (MURPHY et al., 1993, précité) et donne une forme inactive de l'enzyme.

L'augmentation de l'activité catalytique en présence de magnésium n'est cependant pas claire ; elle serait due à un effet indirect sur la K328, qui n'a plus de lien avec la D153.

Aussi bien MATLIN et al. (référence précitée) que JANEWAY et al. (référence précitée) montrent le rôle essentiel du magnésium dans l'évaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

Le mutant K328H/D153H présente le même comportement que le mutant D153H, par rapport au magnésium ; en outre, il présente un K_M diminué et un k_{cat} augmenté.

Ceci montre la complexité de l'action et la difficulté d'évaluation de l'intérêt d'un mutant.

MURPHY et al. (Molecular Microbiology, 1994, **12**, 3, 351-357) résument également les propriétés des mutants D153H, K328H et D153H/K328H et aboutissent aux mêmes conclusions que les différents Auteurs précités.

En conclusion, les mutants K328H ou D153H présentent une augmentation modérée de l'activité spécifique. Le double mutant (D153H/K328H) est plus actif que les simples mutants, mais sa stabilité thermique est moins élevée que celle de l'enzyme sauvage et la présence de magnésium est indispensable à l'expression d'une activité élevée ; en outre, ce double mutant D153H/K328H présente une augmentation du K_M d'un facteur supérieur à 30, ce qui entraîne une diminution du rapport k_{cat}/K_M (faible affinité pour le substrat).

Bien que les résidus His en position 153 et/ou 328 participent aux performances élevées de la CIP, leur seule présence ne suffit pas à conférer à la BAP les caractéristiques recherchées, pour obtenir un outil de diagnostic efficace et stable, c'est-à-dire ayant à la fois :

- une activité catalytique (hydrolyse) de l'ordre de celle de la phosphatase alcaline de mammifère (CIP notamment),
- une grande affinité pour le substrat phosphoré, et
- une grande stabilité thermique, c'est-à-dire de l'ordre de celle de la BAP sauvage.

En conséquence, la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à des phosphatases alcalines bactériennes modifiées, qui répondent mieux aux besoins de la pratique que les phosphatases alcalines de l'Art antérieur.

La présente invention a pour objet une phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence de phosphatase alcaline bactérienne (BAP), dans laquelle au moins l'un des résidus d'acide-amino en position 329 ou en position 330 est substitué par un autre résidu d'acide-amino, laquelle phosphatase alcaline modifiée présente une activité catalytique et une affinité pour le substrat significativement augmentées (activité enzymatique améliorée) par rapport auxdites activités de la phosphatase alcaline bactérienne sauvage correspondante et une stabilité thermique, de l'ordre de celle de ladite phosphatase alcaline bactérienne sauvage.

On entend par résidu d'acide-amino, au sens de la présente invention, n'importe quel résidu d'acide-amino naturel et notamment: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp ou Tyr.

On entend par phosphatase alcaline d'origine bactérienne modifiée (BAPm), une phosphatase alcaline biologiquement active, dont les mutations ne correspondent pas nécessairement à des résidus d'acide-amino de phosphatase alcaline de mammifère (CIP, par exemple), laquelle BAPm peut notamment être obtenue, par mutagenèse aléatoire ou dirigée, à partir d'une phosphatase alcaline chimère, c'est-à-dire d'une phosphatase alcaline bactérienne comprenant au moins deux résidus d'acide-amino d'une phosphatase alcaline de mammifère, et notamment de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP) et biologiquement inactive.

On entend par enzyme présentant une activité enzymatique améliorée une enzyme qui présente un k_{cat} augmenté et/ou un K_M diminué par rapport à une enzyme non modifiée.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite phosphatase alcaline bactérienne modifiée, elle comprend en outre une substitution au niveau du résidu d'acide-amino 153 et/ou du résidu d'acide-amino 328.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite phosphatase alcaline bactérienne modifiée, la substitution au niveau de la position 330 est de préférence la substitution d'un acide aspartique (Asp³³⁰ ou D) par une asparagine (Asn ou N), une alanine (Ala ou A) ou une leucine (Leu ou L).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite phosphatase alcaline modifiée, la substitution au niveau de la position 329 est de préférence la substitution d'une glutamine (Gln³²⁹ ou Q) par une alanine (Ala ou A).

Conformément à l'invention, ladite phosphatase alcaline modifiée comprend en outre une histidine (His ou H) en position 153 à la place d'un acide aspartique (Asp¹⁵³) et/ou une histidine en position 328 à la place d'une lysine (Lys ou K).

Conformément à l'invention, les mutants préférés sont sélectionnés parmi :

le mutant D330N, le mutant D153H/D330N, le mutant K328H/D330N, le mutant D153H/K328H/D330N, le mutant D330A, le mutant D330L, le mutant D153H/D330A, le mutant D153H/D330L, le mutant K328H/D330A, le mutant K328H/D330L, le mutant D153H/K328H/D330A, le mutant D153H/K328H/D330L, le mutant Q329A, le mutant D153H/Q329A, le mutant K328H/Q329A, le mutant D153H/K328H/Q329A.

Egalement conformément à l'invention, la séquence de phosphatase alcaline bactérienne est de préférence issue d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis*.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite phosphatase alcaline bactérienne modifiée, elle comprend, outre au moins l'une des substitutions telles que définies ci-dessus, au moins un acide-amino supplémentaire, inséré entre les acides-amino +6 et +7 de ladite phosphatase alcaline bactérienne.

Parmi ces séquences modifiées, on peut citer la SEQ ID N°2 :

6	7
Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Asp Phe Ser Arg Arg Ala Pro Gly Val	
1 5 10 15	
Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala	
20 25 30	
Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser	
35 40 45	
Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly	
50 55 60	
Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly	
65 70 75 80	

EP 0 752 475 A1

	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	His	
					85					90					95		
5	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	
				100					105					110			
	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Thr	Tyr	Asn	Gly	
			115					120					125				
10	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu	
		130					135					140					
	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	
	145					150					155					160	
15	Leu	Gln	His	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	Val	Thr	Ser	Arg	
		153			165					170					175		
	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro	Gly	Asn	Ala	
				180					185					190			
20	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	
			195					200					205				
	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe	Ala	Glu	Thr	
		210					215					220					
25	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	Glu	Gln	Ala	Gln	
	225					230					235					240	
	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Ser	Val	
				245						250				255			
30	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Gly	
				260					265					270			
	Asn	Met	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Tyr	His	Gly	Asn	
			275					280					285				
35	Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Asn	Asp	
	290						295					300					
	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	Met	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu	
	305					310					315					320	
40	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ala	Ser	Ile	
					325					330					335		
	Asp	His	Gln	Asn	His	Ala	Ala	Asn	Pro	Cys	Gly	Gln	Ile	Gly	Glu	Thr	
				340					345					350			
45	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	Lys	
			355					360					365				
	Glu	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ala	His	Ala	Ser	
		370					375					380					
50	Gln	Ile	Val	Ala	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	
	385					390					395					400	
	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Met	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Glu	
55					405					410					415		

EP 0 752 475 A1

Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr
420 425 430

Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu
435 440 445

Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys *
450 455 460

Dans cette séquence SEQ ID N°2, le fragment souligné correspond aux amino-acides ajoutés entre la proline et la valine, respectivement en positions 6 et 7, dans la phosphatase alcaline sauvage de *E.coli*; les amino-acides en caractères gras correspondent aux amino-acides modifiés et les numéros en italique correspondent aux positions des aminoacides correspondants dans la phosphatase alcaline sauvage de *E. coli*.

Bien que la séquence ci-dessus corresponde au mutant D153H/K328H/D330N, l'invention comprend toutefois également les séquences correspondant aux mutants D330N, D153H/D330N et K328H/D330N, ainsi que les autres mutants précités.

De manière inattendue, des BAP modifiées comme précisé ci-dessus, présentent à la fois :

- des propriétés catalytiques améliorées (notamment amélioration de l'affinité de l'enzyme pour le substrat), aptes à permettre une diminution du temps de révélation, lors de son utilisation dans un test de dosage jusqu'à un facteur 6 par rapport au réactif présentant la séquence bactérienne initiale et/ou d'augmenter la sensibilité de ce test et
- une stabilité thermique de l'ordre de celle de la séquence bactérienne sauvage (BAP).

La présente invention a également pour objet des séquences nucléiques codant pour l'une quelconque des protéines telles que définies ci-dessus.

Parmi lesdites séquences, on peut citer :

- les séquences modifiées, obtenues à partir de la séquence sauvage et
- des séquences modifiées incluant 27 bases supplémentaires entre les bases 18 et 19, c'est-à-dire entre le codon codant pour la proline en position 6 de la phosphatase alcaline sauvage et le codon codant pour la valine en position 7, conformément à la SEQ ID N°1 :

EP 0 752 475 A1

	GTGAAACAAA GCACTATTGC ACTGGCACTC TTACCGTTAC TGTTTACCCC TGTGACAAAA																		60
5	GCC	CGG	ACA	CCA	GAA	ATG	CCC	GTC	GAC	TTC	AGT	CGA	CGA	GCT	CCC	GGG			108
	Arg	Thr	Pro	Glu	Met		Pro	Val	Asp	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala	Pro	Gly			
						5					10					15			
	GTT	CTG	GAA	AAC	CGG	GCT	GCT	CAG	GGC	GAT	ATT	ACT	GCA	CCC	GGC	GGT			156
	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly			
					20					25					30				
10	GCT	CGC	CGT	TTA	ACG	GGT	GAT	CAG	ACT	GCC	GCT	CTG	CGT	GAT	TCT	CTT			204
	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu			
				35				40						45					
15	AGC	GAT	AAA	CCT	GCA	AAA	AAT	ATT	ATT	TTG	CTG	ATT	GGC	GAT	GGG	ATG			252
	Ser	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	Asp	Gly	Met			
			50					55					60						
	GGG	GAC	TCG	GAA	ATT	ACT	GCC	GCA	CGT	AAT	TAT	GCC	GAA	GGT	GCG	GGC			300
	Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Tyr	Ala	Glu	Gly	Ala	Gly			
		65					70					75							
20	GGC	TTT	TTT	AAA	GGT	ATA	GAT	GCC	TTA	CCG	CTT	ACC	GGG	CAA	TAC	ACT			348
	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr			
		80				85					90					95			
25	CAC	TAT	GCG	CTG	AAT	AAA	AAA	ACC	GGC	AAA	CCG	GAC	TAC	GTC	ACC	GAC			396
	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp			
					100					105					110				
	TCG	GCT	GCA	TCA	GCA	ACC	GCC	TGG	TCA	ACC	GGT	GTC	AAA	ACC	TAT	AAC			444
	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Thr	Tyr	Asn			
				115				120						125					
30	GGC	GCG	CTG	GGC	GTC	GAT	ATT	CAC	GAA	AAA	GAT	CAC	CCA	ACG	ATT	CTG			492
	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Thr	Ile	Leu			
			130					135					140						
35	GAA	ATG	GCA	AAA	GCC	GCA	GGT	CTG	GCG	ACC	GGT	AAC	GTT	TCT	ACC	GCA			540
	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala			
		145					150					155							
				153															
	GAG	TTG	CAG	CAC	GCC	ACG	CCC	GCT	GCG	CTG	GTG	GCA	CAT	GTG	ACC	TCG			588
	Glu	Leu	Gln	His	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	Val	Thr	Ser			
		160				165					170					175			
40	CGC	AAA	TGC	TAC	GGT	CCG	AGC	GCG	ACC	AGT	GAA	AAA	TGT	CCG	GGT	AAC			636
	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro	Gly	Asn			
					180					185					190				
45	GCT	CTG	GAA	AAA	GGC	GGA	AAA	GGA	TCG	ATT	ACC	GAA	CAG	CTG	CTT	AAC			684
	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Asn			
				195					200					205					
	GCT	CGT	GCC	GAC	GTT	ACG	CTT	GGC	GGC	GGC	GCA	AAA	ACC	TTT	GCT	GAA			732
	Ala	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe	Ala	Glu			
			210					215					220						
50	ACG	GCA	ACC	GCT	GGT	GAA	TGG	CAG	GGA	AAA	ACG	CTG	CGT	GAA	CAG	GCA			780
	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	Glu	Gln	Ala			
		225					230					235							
55	CAG	GCG	CGT	GGT	TAT	CAG	TTG	GTG	AGC	GAT	GCT	GCC	TCA	CTG	AAT	TCG			828
	Gln	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Ser			
		240				245					250					255			

	GTG	ACG	GAA	GCG	AAT	CAG	CAA	AAA	CCC	CTG	CTT	GGC	CTG	TTT	GCT	GAC	876
	Val	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	
					260					265					270		
5	GGC	AAT	ATG	CCA	GTG	CGC	TGG	CTA	GGA	CCG	AAA	GCA	ACG	TAC	CAT	GGC	924
	Gly	Asn	Met	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Tyr	His	Gly	
				275					280					285			
10	AAT	ATC	GAT	AAG	CCC	GCA	GTC	ACC	TGT	ACG	CCA	AAT	CCG	CAA	CGT	AAT	972
	Asn	Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Asn	
			290					295					300				
15	GAC	AGT	GTA	CCA	ACC	CTG	GCG	CAG	ATG	ACC	GAC	AAA	GCC	ATT	GAA	TTG	1020
	Asp	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	Met	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	
		305				310						315					
20	TTG	AGT	AAA	AAT	GAG	AAA	GGC	TTT	TTC	CTG	CAA	GTT	GAA	GGT	GCG	TCA	1068
	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ala	Ser	
	320				325					330						335	
			328		330												
	ATC	GAT	CAC	CAG	AAT	CAT	GCT	GCG	AAT	CCT	TGT	GGG	CAA	ATT	GGC	GAG	1116
	Ile	Asp	His	Gln	Asn	His	Ala	Ala	Asn	Pro	Cys	Gly	Gln	Ile	Gly	Glu	
					340					345					350		
25	ACG	GTC	GAT	CTC	GAT	GAA	GCC	GTA	CAA	CGG	GCG	CTG	GAA	TTC	GCT	AAA	1164
	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	
				355					360					365			
30	AAG	GAG	GGT	AAC	ACG	CTG	GTC	ATA	GTC	ACC	GCT	GAT	CAC	GCC	CAC	GCC	1212
	Lys	Glu	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ala	His	Ala	
			370					375					380				
35	AGC	CAG	ATT	GTT	GCG	CCG	GAT	ACC	AAA	GCT	CCG	GGC	CTC	ACC	CAG	GCG	1260
	Ser	Gln	Ile	Val	Ala	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala	
		385					390					395					
40	CTA	AAT	ACC	AAA	GAT	GGC	GCA	GTG	ATG	GTG	ATG	AGT	TAC	GGG	AAC	TCC	1308
	Leu	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Met	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	
	400					405				410						415	
45	GAA	GAG	GAT	TCA	CAA	GAA	CAT	ACC	GGC	AGT	CAG	TTG	CGT	ATT	GCG	GCG	1356
	Glu	Glu	Asp	Ser	Gln	Glu	His	Thr	Gly	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Ala	Ala	
					420					425					430		
50	TAT	GGC	CCG	CAT	GCC	GCC	AAT	GTT	GTT	GGA	CTG	ACC	GAC	CAG	ACC	GAT	1404
	Tyr	Gly	Pro	His	Ala	Ala	Asn	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	Asp	
				435				440						445			
55	CTC	TTC	TAC	ACC	ATG	AAA	GCC	GCT	CTG	GGG	CTG	AAA	TAA				1443
	Leu	Phe	Tyr	Thr	Met	Lys	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Lys					
			450					455									

Dans cette séquence SEQ ID N°1, le fragment souligné correspond aux bases ajoutées entre le codon proline et le codon valine ; les séquences en caractères gras correspondent aux codons mutés et les numéros en italique correspondent aux positions des aminoacides correspondants dans la phosphatase alcaline sauvage de *E. coli*.

Bien que la séquence ci-dessus code pour le mutant D153H/K328H/D330N, l'invention comprend toutefois également les séquences codant pour le mutant D330N, le mutant D153H/D330N et le mutant K328H/D330N, ainsi que les autres mutants précités.

La présente invention a également pour objet un plasmide recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour une phosphatase alcaline modifiée conformément à l'invention et apte à exprimer ladite protéine dans une cellule hôte convenable.

Conformément à l'invention, ledit plasmide comprend avantageusement des séquences régulant l'expression de la séquence d'acide nucléique codant pour la phosphatase alcaline modifiée.

On entend par séquences régulatrices, des séquences de type promoteur et terminateur actives ; on peut citer, à titre d'exemple, le promoteur du gène de la phosphatase alcaline (promoteur *phoA*) ou bien le promoteur *tac*, associé au répresseur *lacI^Q* (Carrier et al., J. Immunol. Methods, 1995, 177-186 et Szmelcman et al., J. acquired Immune Defic. Syndr., 1990, 3, 859).

La présente invention a également pour objet une cellule hôte, transformée par un plasmide selon l'invention, notamment une bactérie telle que *E. coli*, ladite cellule hôte étant déficiente pour le gène chromosomique de la phosphatase alcaline, ou n'exprimant pas le gène chromosomique de la phosphatase alcaline dans les conditions où le gène de la phosphatase alcaline porté par le plasmide selon l'invention s'exprime.

La présente invention a également pour objet un procédé de sélection d'une phosphatase alcaline bactérienne modifiée, possédant à la fois une activité catalytique améliorée par rapport à celle de la phosphatase alcaline bactérienne native et une stabilité thermique de l'ordre de celle de ladite phosphatase alcaline native, caractérisé en ce qu'il comprend :

- i) la préparation d'une phosphatase alcaline chimère inactive comprenant l'introduction dans la séquence codant pour la BAP, d'au moins deux codons codant pour deux résidus d'acides aminés d'une phosphatase alcaline de mammifère (CIP, notamment) ;
- ii) la réalisation d'une mutagenèse aléatoire ou dirigée sur le gène codant pour cette phosphatase alcaline chimère inactive ;
- iii) l'expression des phosphatases alcalines obtenues en ii) ;
- iv) la sélection des clones bactériens exprimant une phosphatase alcaline dont l'activité enzymatique est restaurée ; et
- v) le séquençage des phosphatases alcalines modifiées ainsi obtenues et la sélection de la/les mutations de compatibilité à introduire dans une phosphatase alcaline bactérienne sauvage, pour construire ladite phosphatase alcaline bactérienne modifiée active, ayant les propriétés améliorées telles que précisées ci-dessus (activité catalytique augmentée par rapport à celle de la phosphatase alcaline bactérienne native et stabilité thermique de l'ordre de celle de ladite phosphatase alcaline native).

L'étape iv) permet d'obtenir des phosphatases alcalines dites révertantes, c'est-à-dire dont l'activité enzymatique est restaurée, par rapport au produit de l'étape i).

A titre d'exemple, le mutant obtenu à l'étape i) est par exemple le mutant D153H/K328H/Q329G/D330H, correspondant à une phosphatase alcaline chimère inactive et le mutant obtenu à l'étape iv) est par exemple le mutant D153H/K328H/Q329G/D330N, le mutant D153H/K328H/Q329A/D330H, le mutant D153H/K328H/Q329G/D330A ou le mutant D153H/K328H/Q329G/D330L, qui sont des enzymes révertantes, c'est-à-dire biologiquement actives.

Les mutations à l'origine de cette réversion phénotypique sont appelées mutations de compatibilité car elles permettent à deux séquences d'origines différentes de s'adapter l'une à l'autre pour former une protéine modifiée, biologiquement fonctionnelle.

L'étape v) permet la sélection desdites mutations de compatibilité, de manière à construire une phosphatase alcaline bactérienne modifiée active et stable thermiquement, présentant des propriétés enzymatiques (k_{cat} et/ou K_M) améliorées par rapport à l'enzyme sauvage.

Conformément à ce procédé, ladite mutation de compatibilité [sélectionnée aux étapes iv) et v)] confère à une enzyme chimère phosphatase alcaline bactérienne/phosphatase alcaline de mammifère initialement inactive, des propriétés catalytiques performantes. Transférée dans la phosphatase alcaline bactérienne, cette mutation a pour effet d'améliorer les propriétés catalytiques de l'enzyme. Enfin, associée à l'une des autres mutations comme précisé ci-dessus et notamment à la mutation D153H, elle conduit à une enzyme dont les propriétés sont proches de celles des enzymes de mammifère, tout en ayant une stabilité thermique proche de celle de l'enzyme bactérienne.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de l'invention, les mutations introduites à l'étape i) portent au moins sur les résidus d'acide aminé en positions 153, 328, 329 et 330 de l'enzyme bactérienne.

De préférence, elles portent sur l'ensemble des résidus suivants :

- résidu 153 : remplacement de Asp par His,
- résidu 328 : remplacement de Lys par His,
- résidu 329 : remplacement de Gln par Gly,
- résidu 330 : remplacement de Asp par His.

On obtient, en particulier, le mutant D153H/K328H/Q329G/D330H (phosphatase alcaline chimère inactive).

Selon un autre mode de mise en oeuvre dudit procédé, la mutation introduite à l'étape ii) porte au moins sur les résidus d'acides aminés en position 329 et/ou 330 de l'enzyme bactérienne et consiste notamment en la substitution de His en 330 par Asn, par Ala ou par Leu et/ou consiste en la substitution de Gly en position 329 par Ala ; conduisant à

l'obtention des révertants biologiquement actifs précités, à savoir : D153H/K328H/Q329G/D330N, D153H/K328H/Q329G/ D330A, D153H/K328H/Q329G/D330L ou D153H/K328H/Q329A/D330H.

La présente invention a également pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend une phosphatase alcaline modifiée selon l'invention.

Le réactif de diagnostic selon l'invention peut avantageusement être préparé par les voies classiques (couplage chimique) ou par génie génétique, notamment en utilisant une construction telle que décrite dans les Demandes de Brevet européen n°0 407 259 et n°0 556 111.

Les réactifs selon la présente invention trouvent notamment application dans des dosages immuno-enzymatiques ; leurs avantages par rapport aux réactifs incluant la séquence bactérienne sauvage de phosphatase alcaline, sont illustrés, par exemple, soit par une réduction du temps de révélation, jusqu'à un facteur 6 et/ou une augmentation de la sensibilité du test, ou par une augmentation du signal.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente le plasmide de pLIP4.0.B apte à exprimer les gènes codant pour une phosphatase modifiée,
- la figure 2 représente la séquence nucléotidique du vecteur pLIP4.0.B, dans laquelle la séquence codante du gène *phoA* est en gras,
- la figure 3 illustre la stabilité thermique des différentes phosphatases alcalines produites,
- la figure 4 illustre la comparaison des activités enzymatiques des différents traceurs toxine-phosphatase fixés spécifiquement sur un anticorps anti-toxine adsorbé sur plaque de microtitration (mesure de la liaison spécifique obtenue en retranchant la liaison non spécifique de la liaison totale),
- les figures 5A et 5B illustrent l'effet des mutations sur le temps de révélation et la sensibilité d'un dosage immuno-enzymatique par compétition de la toxine,
- la figure 6 représente la séquence du gène inséré codant pour la proinsuline et
- la figure 7A représente la comparaison des temps de révélation nécessaires au dosage de l'insuline en fonction du traceur utilisé et la figure 7B illustre l'effet des mutations sur la sensibilité d'un dosage immuno-enzymatique par compétition de l'insuline.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Construction de gènes chimères codant pour une phosphatase alcaline bactérienne modifiée.

Ces constructions ont été réalisées par mutagénèse dirigée (KUNKEL et al., *Methods Enzymol.*, 1987, **154**, 367-382), sur un dérivé du gène naturel de la phosphatase alcaline bactérienne.

Le vecteur initial est le plasmide pLIP4.0 (GILLET et al., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 1779-1784), dérivé du plasmide pJC2431 possédant le gène sauvage de la phosphatase alcaline bactérienne (LAZZARONI et al., *J. Bacteriol.*, 1985, **164**, 1376-1380). Il contient le gène de la phosphatase alcaline modifié dans sa partie 5' codante par insertion de plusieurs sites de restriction destinés à permettre l'intégration d'un gène étranger.

Par ailleurs, un site de restriction BamHI a été introduit par mutagénèse dirigée sur ce vecteur, en amont de la séquence de Shine-Dalgarno du gène *phoA*. L'oligonucléotide utilisé pour cette expérience correspond à la SEQ ID N°3 :

TGTACAAATACATTAAAGGATCCAAACAAAGCGACTAT

(le site BamHI est indiqué en gras dans la séquence).

Le promoteur *phoA*, encadré par les sites Eco0109 I ou HindIII et BamHI, peut ainsi être changé à volonté. Le vecteur résultant est nommé pLIP4.0.B (figure 1 : représentation schématique du vecteur pLIP4.0.B et figure 2 : séquence nucléotidique du vecteur pLIP4.0.B).

Trois mutations ont été introduites simultanément dans le gène de la phosphatase alcaline d'*E. coli*, afin de substituer les résidus 328, 329 et 330 de l'enzyme bactérienne par les résidus correspondants présents dans les phosphatases de mammifère. Cette expérience a été réalisée sur un fragment SacI/SphI du gène de la phosphatase (*phoA*) inséré dans un phage M13 avec l'oligonucléotide de synthèse correspondant à la SEQ ID N°4 ;

GATTCGCAGCATGATGACCGTGATCGATTGACGC

(la séquence modifiée est indiquée en gras).

Le fragment muté a ensuite été réinséré dans le vecteur pLIP4.0.B et la séquence nucléique contrôlée à nouveau. La mutation D153H a été indépendamment construite selon un protocole identique, avec un oligonucléotide adapté, et ajoutée aux trois mutations précédentes par recombinaison génétique. Le quadruple mutant obtenu est le suivant : D153H/K328H/Q329G/D330H. La première lettre indique le résidu initialement présent sur la phosphatase alcaline bactérienne, le nombre correspond à la position du résidu dans la séquence bactérienne sauvage et la seconde lettre représente la mutation introduite qui correspond à l'acide aminé présent dans les phosphatases de mammifères.

EXEMPLE 2 : Production, purification et caractéristiques enzymatiques des phosphatases alcalines chimères.

Les différentes constructions génétiques décrites dans l'exemple 1, ainsi que le vecteur pJC2431 contenant le gène sauvage de la phosphatase alcaline bactérienne, ont été introduits dans la souche de *E. coli* CC118 déficiente pour le gène chromosomique de la phosphatase alcaline (MANOIL et BECKWITH, P.N.A.S., 1985, **82**, 8129-8131).

Les clones bactériens ont été cultivés sur un milieu contenant le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate. Les colonies exprimant une phosphatase alcaline possédant une activité spécifique suffisamment élevée hydrolysent le substrat et apparaissent en bleu. C'est le cas des bactéries contenant les plasmides pJC2431 et pLIP4.0.B. Le clone ayant intégré le plasmide pLIP4.0.B.-D153H/K328H/Q329G/D330H par contre est blanc et apparaît incapable d'hydrolyser le substrat colorimétrique. La protéine produite est donc dépourvue d'activité enzymatique.

La purification des différentes phosphatases alcalines est effectuée à partir de 200 ml de culture bactérienne. Les protéines périplasmiques sont extraites par choc osmotique (NEU et HEPPEL, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 3685-3692), puis concentrées 20 fois et dialysées contre un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, MgCl₂ 1 mM sur membrane Centricon® 30. Les protéines sont séparées par isoélectrofocalisation sur une colonne Mono P HR® 5/5 Pharmacia.

Les différentes phosphatases alcalines sont ensuite isolées des composants du tampon sur un tamis moléculaire (G-75 Pharmacia) et conservées dans un milieu contenant 10 mM de MgCl₂. La pureté des protéines obtenues est contrôlée sur un gel polyacrylamide-SDS.

La mobilité électrophorétique observée est identique pour toutes les protéines produites à partir des vecteurs dérivés de pLIP4. Elle est inférieure à celle obtenue pour une phosphatase alcaline commerciale (Sigma) ou produite à partir du gène sauvage contenu dans le vecteur pJC2431. Cette différence correspond à 1000 da environ. Elle est en accord avec la présence des 9 acides aminés supplémentaires présents dans la partie N-terminale des phosphatases spécifiés par les vecteurs dérivés de pLIP4. Ces résidus correspondent aux sites de restriction additionnels introduits sur le gène des vecteurs pLIP4. Une mesure au scanner montre que cette bande représente plus de 95 % des protéines colorées sur le gel.

Les constantes cinétiques (*k*_{cat} et *K*_M) des enzymes ont été mesurées en utilisant le para-nitrophényl-phosphate (pNPP) comme substrat, à 25°C dans un tampon Tris-HCl 1M pH 8,0 et en mesurant la libération de p-nitrophénolate à 410 nm, comme illustré au Tableau I ci-après, dans les conditions suivantes : préincubation en Tris-HCl 1 M pH 8,0 Mg²⁺ 10 mM, réaction en Tris-HCl 1 M pH 8,0.

TABLEAU I

	<i>k</i> _{cat} (s ⁻¹)	<i>K</i> _M (μM)	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _M (10 ⁶ M ⁻¹ .s ⁻¹)
pJC2431	65 ± 1	23 ± 0,1	2,8
pLIP4.0.B	78 ± 4	30 ± 5	2,6
D153H/K328H/Q329G/D330H	< 0,7	ND	ND

Les valeurs de *k*_{cat} et *K*_M ont été obtenues à partir de la représentation graphique de Eadie et Hofstee (*v*_i=(*v*_i/*s*)) (L. PENASSE, Les enzymes : cinétique et mécanismes d'action, MASSON et CIE, eds, 1974) et calculées à l'aide du logiciel KALEIDAGRAPH® (publié par Synergy Software). L'enzyme obtenue à partir du plasmide pLIP4.0.B présente des paramètres cinétiques voisins de ceux de l'enzyme de type sauvage. La présence d'une insertion dans la région N-terminale de la protéine ne modifie donc pas de façon significative l'activité catalytique de l'enzyme.

L'addition de la mutation D153H à ces modifications rend l'enzyme totalement silencieuse alors qu'elle continue à être produite normalement par la bactérie. Ainsi, l'introduction de 4 résidus issus de mammifère dans la phosphatase alcaline bactérienne est incompatible avec le maintien d'une forme enzymatiquement fonctionnelle. La présence de deux d'entre eux seulement, les mutations D153H et K328H a un effet limité sur les propriétés enzymatiques (JANEWAY

et al., Biochemistry, 1993, **32**, 1601-1609). La boucle 328-330 et plus précisément les résidus 329 et 330 jouent donc un rôle important dans la perte d'activité observée.

EXEMPLE 3 : Mutagenèse aléatoire sur la chimère inactive, sélection de révertants phénotypiques, identification des mutations à l'origine de cette réversion.

Une mutagenèse aléatoire est réalisée sur la portion SacI-SphI du quadruple mutant de phosphatase alcaline par la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SAIKI et al., Science, 1988, **239**, 487-491).

L'expérience est réalisée avec la Taq polymérase (BRL), qui commet en moyenne une erreur pour 30 000 nucléotides incorporés, et les oligonucléotides correspondant respectivement aux SEQ ID N° 5 et N° 6 :

AACAACATTGGCGGCATGCGGGCC (le site SphI est en gras

dans la séquence)

GACTTCAGTCGACGAGCTCCCGGG (le site SacI est en gras

dans la séquence).

Le nombre de cycles d'amplification est de 30. Le fragment de gène obtenu est contrôlé sur gel d'agarose et purifié sur Sephaglass® (Pharmacia). Il est ensuite digéré par les enzymes SacI et SphI puis réinséré dans le plasmide d'origine en place du fragment SacI-SphI non mutagénéisé.

La transformation des bactéries CC118 par le produit de ligation est effectuée par électroporation (Système Biorad) et les clones sont étalés sur milieu inducteur de la phosphatase alcaline contenant de l'ampicilline et un substrat colorimétrique de l'enzyme, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, dont l'hydrolyse conduit à un produit de couleur bleue.

Deux clones bleus ont été obtenus pour 50 000 blancs. L'origine de cette réversion phénotypique a été recherchée par le séquençage des gènes correspondants. Il révèle la présence d'une seule et même mutation H330N chez ces deux clones. Ce type de mutation a été nommé mutation de compatibilité de par sa propriété à rendre compatible la présence sur un même gène de résidus appartenant à deux phosphatases d'origine différente et qui donne initialement une enzyme dépourvue d'activité catalytique.

EXEMPLE 4 : Propriétés enzymatiques de la phosphatase alcaline produite par le clone révertant (vecteur pLIP4.0.B.-D153H/K328H/Q329G/H330N).

La phosphatase alcaline synthétisée par le clone sélectionné dans l'exemple 3 a été purifiée selon la procédure décrite dans l'exemple 2 et ses propriétés catalytiques ont été mesurées à pH 8, comme illustré au Tableau II ci-après, dans les conditions suivantes : préincubation en Tris-HCl 1 M pH 8,0 Mg²⁺ 10 mM, réaction en Tris-HCl 1 M pH 8,0.

TABLEAU II

	kcat (s ⁻¹)	K _M (μM)	kcat/K _M (10 ⁶ M ⁻¹ .s ⁻¹)
pLIP4.0.B	78 ± 4	30 ± 5	2,6
D153H/K328H/Q329G/H330N (révertant)	82 ± 2	49 ± 6	1,7
D330N	148 ± 3	20 ± 2	7,2
K328H	78 ± 2	58 ± 2	1,3
K328H/D330N	53 ± 2	114 ± 9	0,5
D153H	110 ± 4	50 ± 5	2,2
D153H/D330N	215 ± 18	34 ± 7	6,4
D153H/K328H/D330N	160 ± 4	52 ± 6	3,1

L'activité catalytique mesurée est similaire à celle de l'enzyme bactérienne de type sauvage. L'affinité pour le substrat est légèrement diminuée.

La mutation de compatibilité H330N (qui ne correspond ni à un résidu naturel de l'enzyme, ni à un résidu présent sur les enzymes de mammifère) est donc capable de conférer des propriétés catalytiques performantes à l'enzyme mutée.

On a contrôlé, par ailleurs, que la présence d'un résidu 330D (résidu présent sur la phosphatase bactérienne) ne conduit pas à un tel résultat.

EXEMPLE 5 : Propriétés de la mutation 330N seule ou en combinaison avec les différentes mutations de type mammifère.

L'impact de la mutation 330N dans un contexte phosphatase alcaline bactérienne sauvage ou en combinaison avec les mutations D153H et/ou K328H, a été évalué.

Pour réaliser cette étude, la mutation D330N a été introduite par mutagenèse dirigée dans le gène porté par le vecteur pLIP4.0.B. initial ou modifié par D153H, K328H ou D153H/K328H, par mutagenèse dirigée également.

Les protéines ont été produites et purifiées comme dans l'exemple 2.

Les paramètres cinétiques à pH 8 et à pH 10 ont été déterminés et sont indiqués dans le Tableau II ci-dessus et le Tableau III ci-après.

Par rapport aux constantes déterminées pour l'enzyme produite à partir du vecteur pLIP4.0.B., la mutation D330N induit à pH 8, une augmentation d'un facteur 2 de la vitesse de catalyse de l'enzyme modifiée associée à une augmentation de 30 % de l'affinité pour le substrat. En combinaison avec la mutation K328H, la vitesse de catalyse tombe sous le niveau de celle de l'enzyme initiale et l'affinité pour le substrat chute d'un facteur 3 à 4. La mutation K328H seule ne modifie pas la vitesse de catalyse de l'enzyme, mais provoque une chute d'affinité d'un facteur 2. Ce dernier résultat est en accord avec les travaux publiés par JANEWAY et al., Biochemistry, 1993, **32**, 1601-1609.

De manière inattendue, associée à la mutation D153H, la mutation D330N induit une augmentation de vitesse de catalyse d'un facteur proche de 3 et ne modifie pas de façon significative l'affinité pour le substrat.

Dans des conditions similaires, la mutation D153H seule augmente seulement 1,4 fois la vitesse de catalyse et diminue d'un facteur proche de 2 l'affinité pour le substrat.

Enfin, le triple mutant D153H/K328H/D330N voit sa vitesse de catalyse retomber au niveau de celle du mutant D330N seul et induit une baisse d'un facteur 2 de l'affinité pour le substrat.

Ce résultat est à comparer à ceux obtenus avec le double mutant D153H/K328H (JANEWAY et al., Biochemistry, 1993, **32**, 1601-1609) qui montrent une diminution d'un facteur 4 de la vitesse de catalyse et 3 de l'affinité pour le substrat par rapport à l'enzyme sauvage.

A pH 10, l'enzyme produit à partir du plasmide pLIP4.0.B présente une vitesse de catalyse similaire à celle observée en Tris 1 M à pH 8 et une affinité pour le substrat diminuée d'un facteur 3, comme illustré au Tableau III ci-après, dans les conditions suivantes: préincubation en CAPS (cyclohexylaminopropane sulfonic acid) 0,1 M NaCl 0,4 M pH 10,0 Mg²⁺ 10 mM, réaction en CAPS 0,1 M NaCl 0,4 M pH 10,0 Mg²⁺ 10 mM.

TABLEAU III

	kcat (s ⁻¹)	K _M (μM)	kcat/K _M (10 ⁶ M ⁻¹ .s ⁻¹)
pLIP4.0.B	80 ± 3	90 ± 8	0,9
D153H/K328H/Q329G/H330N (révertant)	227 ± 4	562 ± 45	0,4
D330N	201 ± 10	47 ± 4	4,3
K328H	214 ± 11	105 ± 11	2,0
K328H/D330N	254 ± 20	112 ± 9	2,3
D153H	240 ± 12	320 ± 30	0,8
D153H/D330N	1389 ± 110	350 ± 30	4,0
D153H/K328H/D330N	650 ± 43	170 ± 16	3,8

Ce résultat est voisin de celui observé par JANEWAY et al., 1993, sur l'enzyme sauvage. Là encore, l'insertion de plusieurs acides aminés en N-terminal de l'enzyme ne modifie pas son comportement de façon significative.

Le clone révertant possède une activité catalytique augmentée d'un facteur 3, mais une affinité pour le substrat diminuée d'un facteur 6. Le mutant D330N possède une vitesse de catalyse 2,5 fois plus élevée que l'enzyme non mutée, dans les mêmes conditions et une affinité qui s'élève d'un facteur 2.

Le double mutant K328H/D330N présente une activité 3 fois supérieure et une affinité diminuée légèrement de 20% environ. Le double mutant D153H/D330N présente une vitesse de catalyse augmentée 17 fois par rapport à l'enzyme initiale, 7 fois par rapport au simple mutant D330N et 6 fois par rapport au simple mutant D153H. Dans ce cas, il y a un véritable effet synergique entre ces deux mutations D153H/D330N. Par contre, l'affinité pour le substrat diminue d'un facteur 4 environ par rapport à l'enzyme bactérienne et cette chute peut être attribuée à la mutation D153H qui, seule, induit un effet similaire. L'association des trois mutations D153H/K328H/D330N engendre une vitesse de catalyse et une affinité intermédiaires par rapport aux valeurs obtenues pour les deux doubles mutants.

La combinaison D153H/D330N constitue la construction la plus efficace en terme de vitesse de catalyse qui atteint une valeur approchant celle de la CIP dont le k_{cat} est de l'ordre de 2000 s^{-1} .

La stabilité thermique des enzymes produites par le vecteur pLIP4.0.B et les dérivés D153H, D330N et D153H/D330N a été mesurée (figure 3). Les enzymes sont préincubées 2 h à 25°C dans un tampon Tris 1 M pH 8 Mg^{++} 100 mM.

Un aliquot est porté à la température indiquée pendant 15 min dans un tampon Tris 1 M pH 8, 10 mM Mg^{++} . Après refroidissement dans la glace, la mesure de l'activité enzymatique est réalisée en présence de 5 mM de paranitrophényl phosphate pendant 15 min à 25°C .

La protéine produite par le vecteur pLIP4.0.B (courbe $\bullet$) et le mutant D330N (courbe $\diamond$) ont une température de demi-dénaturation de 95°C environ, similaire à celle de la phosphatase alcaline bactérienne naturelle. Ni l'insertion en N-terminal de plusieurs acides aminés, ni la mutation D330N ne provoquent une augmentation de sensibilité de l'enzyme à la température. Par contre, le mutant D153H (courbe $\square$) et le double mutant D153H/D330N (courbe $\times$) ont une température de demi-dénaturation de 70°C environ, similaire à celle publiée pour le mutant D153H par JANEWAY et al., 1993. Cette valeur est nettement supérieure à la valeur publiée pour la CIP et qui se situe aux environs de 55°C ou 65°C en présence de Mg^{2+} (conditions contrôles établies pour l'exemple).

EXEMPLE 6 : Construction de vecteurs de fusion toxine-mutants de phosphatase alcaline.

Les vecteurs pLIP4.0.B, pLIP4.0.B/D330N, pLIP4.0.B/D153H/D330N ont été digérés par l'enzyme Sall et refermés sur eux-mêmes de façon à créer un déphasage du cadre de lecture du gène *phoA*. Les bactéries CC118 transformées par ces vecteurs apparaissent blanches sur milieu inducteur de *PhoA* contenant de l'ampicilline et le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate. Ces vecteurs déphasés sont nommés pLIP4.B, pLIP4.B/D330N, pLIP4.B/D153H/D330N.

Une réaction de PCR est réalisée sur la portion du vecteur pLIP1 (GILLET et al., Protein Ingeneering, 1992, **5**, 3, 273-278) portant le gène codant pour la toxine de venin de serpent érabutoxine α , de façon à introduire aux extrémités du gène les sites Sall et XmaI nécessaires au clonage dans les vecteurs pLIP4. Les oligonucléotides utilisés correspondent respectivement aux SEQ ID N° 7 et SEQ ID N° 8 :

GAAATGCCCGTCGACAGGATATGTTTTAAC (le site Sall est

en gras dans la séquence),

GAACCCCGGGAGCTCCATTGTTGCAGACCT (le site XmaI est

en gras dans la séquence).

Le nombre de cycles d'amplification est de 30. Le gène obtenu est contrôlé sur gel d'agarose « Low Melting Point » et extrait du gel par des traitements au phénol et au chloroforme. Il est ensuite digéré par les enzymes de restriction Sall et XmaI et inséré dans l'ADN double brin du phage M13mp18 afin d'en contrôler la séquence.

Puis le gène est inséré entre les sites Sall et XmaI des vecteurs pLIP4.B, pLIP4.B/D330N, pLIP4.B/D153H/D330N. Les bactéries CC118 sont transformées par le produit de ligation et étalées sur un milieu inducteur de la phosphatase alcaline contenant de l'ampicilline et le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.

Les colonies exprimant la protéine de fusion érabutoxine α /Phosphatase alcaline (Ea/PhoA) hydrolysent le substrat et apparaissent en bleu. 21 clones bleus pour 300 clones blancs ont été obtenus pour la construction pLIP4.B/Ea, 4 clones bleus pour 100 blancs pour la construction pLIP4.B-D330N/Ea et 4 clones bleus pour 113 blancs pour la construction pLIP4.B-D153H-D330N/Ea. La présence de l'insert dans les constructions a été vérifiée par restriction SacI/XmaI (insert d'environ 200 pb) et la séquence du gène codant pour Ea a été de nouveau vérifiée par séquençage.

EXEMPLE 7 : Production/extraction des traceurs immuno-enzymatiques.

La production des différentes protéines de fusion est effectuée à partir de 400 ml de culture bactérienne. Les protéines périplasmiques sont extraites par choc osmotique puis concentrées sur membrane YM-30 AMICON jusqu'à un volume de 1 ml et dialysés contre un tampon Tris-HC 20 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM, pour l'hybride non modifié et le mutant D330N; un tampon Tris-HC 20 mM pH 8, MgCl₂ 100 mM pour le mutant D153H/D330N. Les solutions sont conservées à -20°C en présence de NaN₃ 0,02 %.

EXEMPLE 8 : Comparaison des activités enzymatiques des différents traceurs érabutoxine-a/phosphatase alcaline modifiée, fixés spécifiquement sur un anticorps anti-toxine adsorbé sur plaque de microtitration et effet des mutations sur le temps de révélation et la sensibilité d'un dosage immunoenzymatique par compétition de la toxine.**1) Activité enzymatique :**

L'anticorps monoclonal Mα2-3 spécifique des toxines (TREMEAU et al., FEBS Lett., 1986, **208**, 236-240) est adsorbé une nuit à 4°C sur plaque de microtitration à raison de 10 ng par puits dans un volume de 50 µl de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Les puits sont ensuite saturés une nuit à 4°C avec 250 µl d'une solution Tris-HCl 100 mM pH 7,4 contenant 0,3 % de sérum albumine bovine.

5 lavages sont réalisés avec un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 0,05 % Tween® 2.

Les dilutions des différents traceurs sont réalisées dans un tampon Tris-HCl pH 7,4 100 mM, 0,1 % sérum albumine bovine, 10 mM MgCl₂. 50 µl de ces dilutions sont ajoutés dans les puits de titration et incubés une nuit à 4°C.

5 lavages sont réalisés avec un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 0,05 % Tween® 2.

La quantité de traceur fixée sur les plaques est révélée par addition de 200 µl de Tris-HCl 1 M pH 8, 10 mM MgCl₂, 10 mM para-nitro-phényl-phosphate (pNPP) pour le traceur non modifié et celui portant la mutation D330N; 200 µl de tampon CAPS 100 mM pH 10,0, 400 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM pNPP sont utilisés pour le traceur portant les deux mutations D153H/D330N. La densité optique est mesurée à 410 nm après 2 heures 30 et 24 h d'incubation à température ambiante.

Les mêmes expériences sont réalisées en présence d'un excès de toxine (50 µl d'une solution de toxine à 1 mg/ml) afin de mesurer la liaison non spécifique qui est retranchée de la liaison totale. Les résultats sont reportés sur la figure 4.

2) Effet des mutations sur le temps de révélation et la sensibilité :

Des courbes d'étalonnage sont réalisées avec les plaques de microtitration préparées comme en 1), avec l'anticorps Mα2-3. Les différents traceurs sont utilisés à la même concentration et l'érabutoxine est utilisée en concentrations variables (10⁻⁵ à 10⁻¹² M) comme compétiteur. 200 µl de solution contenant 10 mM de substrat pNPP sont ajoutés dans un tampon Tris-HCl 1 M pH 8, 10 mM MgCl₂ pour le traceur non muté et pour le traceur muté en position D330N. L'incubation est réalisée dans un tampon CAPS 100 mM pH 10, 400 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ pour le double mutant D153H/D330N. Les courbes de compétition standard obtenues sont représentées sur la figure 5A.

Dans une seconde série d'expériences réalisée dans les mêmes tampons que précédemment, la concentration du traceur contenant la double mutation D153H/D330N est diminuée d'un facteur 16, de façon à donner un même signal (0,5 DO à 410 nm en 6 heures) que le traceur ne contenant pas de mutation, en l'absence de compétiteur. Dans ces conditions, la quantité de toxine nécessaire pour inhiber 50 % du signal enzymatique est diminuée d'un facteur 17 lorsque l'on utilise le traceur portant les mutations (0,4 nM au lieu de 7 nM). Les résultats sont présentés à la figure 5B.

Ces résultats montrent que le temps de révélation du dosage est réduit d'un facteur 2 pour le mutant D330N et d'un facteur 6 pour le mutant D153H/D330N et que la sensibilité du dosage (exprimée pour la concentration d'antigène inhibant 50 % du signal) est améliorée d'un facteur 17 (cas du double mutant).

EXEMPLE 9 : Construction des vecteurs de fusion proinsuline-mutants de phosphatase alcaline et production des traceurs immuno-enzymatiques.

Un gène de synthèse codant pour la proinsuline humaine a été construit et inséré aux sites Sall et SacI du vecteur pLIP5 (CARRIER et al., J.I.M., 1995, **181**, 177-186) qui est un dérivé du vecteur pLIP4.B dans lequel le promoteur phoA a été remplacé par le promoteur *tac* associé au répresseur *lacI^Q*. La séquence du gène inséré codant pour la proinsuline est représentée à la figure 6.

Les mutations D330N et D153H/D330N ont été introduites dans ce vecteur par recombinaison génétique entre

les vecteurs pLIP4.0.B. portant ces mutations et le vecteur pLIP5-proinsuline.

Les constructions obtenues ont été vérifiées par séquençage. Les plasmides obtenus ont été utilisés pour transformer la souche *E. coli* W3110 (American Type Culture Collection n° 27325).

La production des différents traceurs proinsuline-phosphatase alcaline est effectuée à partir de 400 ml de culture bactérienne. Les échantillons sont traités comme dans l'exemple 7.

EXEMPLE 10 : Effet des mutations sur le temps de révélation et la sensibilité d'un dosage immunoenzymatique par compétition de l'insuline.

1) Comparaison des temps de révélation :

Dans un premier temps, la quantité des différents traceurs a été mesurée en équivalent insuline par un test commercial RIA par compétition (Kit INSI-PR), de façon à standardiser les solutions de traceurs utilisées dans les tests ELISA qui suivent. La même quantité de traceur sera ainsi introduite dans les différents tests réalisés.

Des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris (IgG+IgM, H+L, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore) ont été adsorbés sur des plaques de microtitration une nuit à 4°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à raison de 100 µl par puits à la concentration de 10 µg/ml. Les puits sont saturés ensuite une nuit à 4°C avec 200 µl d'une solution de Tris-HCl 100 mM pH 7,4, 0,3 % sérum albumine bovine. Après lavages comme dans l'exemple 8, 50 µl d'une solution standardisée de traceur immunoenzymatique, 50 µl de différentes concentrations d'insuline humaine puis 50 µl d'une solution d'anticorps monoclonal anti-insuline, sont ajoutés dans les puits de microtitration et incubés une nuit à 4°C. Le tampon d'incubation est Tris-HCl 100 mM pH 7,4, 0,1 % sérum albumine bovine, 10 mM MgCl₂. Les puits sont lavés, puis 200 µl de tampon contenant 10 mM de substrat pNPP sont ajoutés dans un tampon Tris-HCl 1 M pH 8, 10 mM MgCl₂ pour le traceur non muté et pour le traceur muté en position D330N, alors que pour le traceur D153H/D330N, l'incubation est réalisée dans un tampon CAPS 100 mM pH 10, 400 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. La lecture de la densité optique à 410 nm est réalisée lorsqu'elle atteint 0,5 en absence d'insuline. Les résultats sont présentés sur la figure 7A.

2) Effet des mutations sur le temps de révélation et la sensibilité d'un dosage immunoenzymatique par compétition de l'insuline :

Dans une seconde expérience, la concentration du traceur portant la double mutation D153H/D330N est diminuée d'un facteur 16 de façon à obtenir la même DO à 410 nm de 0,5 après 6 heures de révélation en absence de compétiteur pour le traceur portant les mutations et celui sans mutation. Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment et les résultats sont présentés figure 7B. La concentration d'insuline nécessaire pour diminuer de moitié le signal obtenu est 4,5 fois plus faible lorsque l'on utilise le traceur portant les mutations que lorsqu'il s'agit du traceur sans mutation (27 µU et 120 µU respectivement).

Ces résultats montrent que le temps de révélation du dosage est réduit d'un facteur 2 pour le mutant D330N et d'un facteur 6 pour le mutant D153H/D330N et que la sensibilité du dosage (exprimée pour la concentration d'antigène inhibant 50 % du signal) est améliorée d'un facteur 4,5 (cas du double mutant).

EXEMPLE 11 : Mutagenèse dirigée sur la chimère inactive, au niveau des positions 329 et/ou 330 : sélection des révertants biologiquement actifs.

En réalisant une mutagenèse dirigée (KUNKEL et al., Methods Enzymol., 1987, **154**, 367-382, précité) sur les positions 329 et 330 respectivement, à partir de la chimère inactive selon l'exemple 1, on obtient les révertants suivants :

D153H/K328H/Q329A/D330H
D153H/K328H/Q329G/D330A
D153H/K328H/Q329G/D330L

qui sont actifs biologiquement et présentent notamment une affinité améliorée pour le substrat enzymatique.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
 (B) RUE: 31-33 RUE DE LA FEDERATION
 (C) VILLE: PARIS
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PHOSPHATASES ALCALINES BACTERIENNES
 MODIFIEES ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 95 07833
 (B) DATE DE DEPOT: 29-JUN-1995

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1443 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "modified DNA"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 64..1440

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

GTGAAACAAA GCACTATTGC ACTGGCACTC TTACCGTTAC TGTTTACCCC TGTGACAAAA 60
GCC CGG ACA CCA GAA ATG CCC GTC GAC TTC AGT CGA CGA GCT CCC GGG 108
  Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Asp Phe Ser Arg Arg Ala Pro Gly
    1           5           10           15

GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT 156
Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly
          20          25          30

GCT CGC CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC GCT CTG CGT GAT TCT CTT 204
Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ser Leu
          35          40          45

AGC GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG 252
Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met
    50          55          60

```

EP 0 752 475 A1

	GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC	300
	Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly	
	65 70 75	
5	GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT	348
	Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr	
	80 85 90 95	
10	CAC TAT GCG CTG AAT AAA AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC	396
	His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp	
	100 105 110	
	TCG GCT GCA TCA GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC	444
	Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn	
	115 120 125	
15	GGC GCG CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG	492
	Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu	
	130 135 140	
20	GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT AAC GTT TCT ACC GCA	540
	Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser Thr Ala	
	145 150 155	
	GAG TTG CAG CAC GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG	588
	Glu Leu Gln His Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser	
	160 165 170 175	
25	CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC	636
	Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn	
	180 185 190	
30	GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC	684
	Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu Asn	
	195 200 205	
	GCT CGT GCC GAC GTT ACG CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA	732
	Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe Ala Glu	
	210 215 220	
35	ACG GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG GCA	780
	Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu Gln Ala	
	225 230 235	
40	CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA CTG AAT TCG	828
	Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu Asn Ser	
	240 245 250 255	
	GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT GGC CTG TTT GCT GAC	876
	Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe Ala Asp	
	260 265 270	
45	GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG AAA GCA ACG TAC CAT GGC	924
	Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr His Gly	
	275 280 285	
50	AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT	972
	Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn	
	290 295 300	
55	GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG	1020
	Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu Leu	
	305 310 315	

EP 0 752 475 A1

	TTG	AGT	AAA	AAT	GAG	AAA	GGC	TTT	TTC	CTG	CAA	GTT	GAA	GGT	GCG	TCA	1068
	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ala	Ser	
	320					325					330					335	
5	ATC	GAT	CAC	CAG	AAT	CAT	GCT	GCG	AAT	CCT	TGT	GGG	CAA	ATT	GGC	GAG	1116
	Ile	Asp	His	Gln	Asn	His	Ala	Ala	Asn	Pro	Cys	Gly	Gln	Ile	Gly	Glu	
					340					345						350	
	ACG	GTC	GAT	CTC	GAT	GAA	GCC	GTA	CAA	CGG	GCG	CTG	GAA	TTC	GCT	AAA	1164
10	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	
				355					360					365			
	AAG	GAG	GGT	AAC	ACG	CTG	GTC	ATA	GTC	ACC	GCT	GAT	CAC	GCC	CAC	GCC	1212
	Lys	Glu	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ala	His	Ala	
				370				375					380				
15	AGC	CAG	ATT	GTT	GCG	CCG	GAT	ACC	AAA	GCT	CCG	GGC	CTC	ACC	CAG	GCG	1260
	Ser	Gln	Ile	Val	Ala	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala	
		385					390					395					
	CTA	AAT	ACC	AAA	GAT	GGC	GCA	GTG	ATG	GTG	ATG	AGT	TAC	GGG	AAC	TCC	1308
20	Leu	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Met	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	
	400					405				410						415	
	GAA	GAG	GAT	TCA	CAA	GAA	CAT	ACC	GGC	AGT	CAG	TTG	CGT	ATT	GCG	GCG	1356
	Glu	Glu	Asp	Ser	Gln	Glu	His	Thr	Gly	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Ala	Ala	
					420				425					430			
25	TAT	GGC	CCG	CAT	GCC	GCC	AAT	GTT	GTT	GGA	CTG	ACC	GAC	CAG	ACC	GAT	1404
	Tyr	Gly	Pro	His	Ala	Ala	Asn	Val	Gly	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	Asp		
				435				440					445				
	CTC	TTC	TAC	ACC	ATG	AAA	GCC	GCT	CTG	GGG	CTG	AAA	TAA				1443
30	Leu	Phe	Tyr	Thr	Met	Lys	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Lys					
			450					455									

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 459 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

	Arg	Thr	Pro	Glu	Met	Pro	Val	Asp	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala	Pro	Gly	Val
	1				5					10					15	
45	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ala
			20					25					30			
	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser
			35				40					45				
50	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	Asp	Gly	Met	Gly
	50					55					60					
	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Tyr	Ala	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly
	65				70			75							80	
55	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	His
				85				90						95		

EP 0 752 475 A1

	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser
				100					105					110		
5	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Thr	Tyr	Asn	Gly
			115					120					125			
	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu
		130					135					140				
10	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Glu
	145					150					155					160
	Leu	Gln	His	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	Val	Thr	Ser	Arg
				165						170					175	
15	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro	Gly	Asn	Ala
				180					185					190		
	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala
			195					200					205			
20	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe	Ala	Glu	Thr
		210					215					220				
	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	Glu	Gln	Ala	Gln
	225					230					235					240
25	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Ser	Val
				245						250					255	
	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Gly
			260						265					270		
30	Asn	Met	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Tyr	His	Gly	Asn
			275					280					285			
	Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Asn	Asp
		290					295					300				
35	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	Met	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu
	305					310					315					320
	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ala	Ser	Ile
				325						330					335	
40	Asp	His	Gln	Asn	His	Ala	Ala	Asn	Pro	Cys	Gly	Gln	Ile	Gly	Glu	Thr
			340					345						350		
	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	Lys
		355						360					365			
45	Glu	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ala	His	Ala	Ser
		370					375					380				
	Gln	Ile	Val	Ala	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu
	385					390					395					400
50	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Met	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Glu
				405						410					415	
	Glu	Asp	Ser	Gln	Glu	His	Thr	Gly	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Ala	Ala	Tyr
				420				425						430		
55	Gly	Pro	His	Ala	Ala	Asn	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	Asp	Leu
			435					440					445			

Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys
450 455

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucleotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TGTACAAATA CATTAAAGGA TCCAAACAAA GCGACTAT 38

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucleotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GATTGCGAGC ATGATGACCG TGATCGATTG ACGC 34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucleotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

AACAACATTG GCGGCATGCG GGCC 24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucleotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GACTTCAGTC GACGAGCTCC CGGG 24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucleotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GAAATGCCCCG TCGACAGGAT ATGTTTTTAAC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucleotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GAACCCCGGG AGCTCCATTG TTGCAGACCT

30

Revendications

1. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence de phosphatase alcaline bactérienne (BAP), dans laquelle au moins l'un des résidus d'acide-amino en position 329 ou en position 330 est substitué par un autre résidu d'acide-amino, laquelle phosphatase alcaline modifiée présente une activité catalytique et une affinité pour le substrat significativement augmentées par rapport auxdites activités de la phosphatase alcaline bactérienne sauvage correspondante et une stabilité thermique, de l'ordre de celle de ladite phosphatase alcaline bactérienne sauvage.
2. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une substitution au niveau du résidu d'acide-amino 153 et/ou du résidu d'acide-amino 328.
3. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que la substitution au niveau de la position 330 est de préférence la substitution d'un acide aspartique (Asp³³⁰ ou D) par une asparagine (Asn ou N), une alanine (Ala ou A) ou une leucine (Leu ou L).
4. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la substitution au niveau de la position 329 est de préférence la substitution d'une glutamine (Gln³²⁹ ou Q) par une alanine (Ala ou A).
5. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une histidine (His ou H) en position 153 à la place d'un acide aspartique (Asp¹⁵³) et/ou une histidine en position 328 à la place d'une lysine (Lys ou K).
6. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe qui comprend le mutant D330N, le mutant D153H/D330N, le mutant K328H/D330N et le mutant D153H/K328H/D330N, le mutant D330A, le mutant D330L, le mutant D153H/D330A, le mutant D153H/D330L, le mutant K328H/D330A, le mutant K328H/D330L, le mutant D153H/K328H/D330A, le mutant D153H/K328H/D330L, le mutant Q329A, le mutant D153H/Q329A, le mutant K328H/Q329A, le mutant

D153H/K328H/Q329A.

7. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la séquence de phosphatase alcaline bactérienne est de préférence issue d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis*.
8. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la séquence de phosphatase alcaline bactérienne comprend, outre au moins l'une des substitutions telles que définies aux revendications 1 à 6, au moins un amino-acide supplémentaire, inséré entre les amino-acides +6 et +7 de ladite phosphatase alcaline bactérienne.
9. Phosphatase alcaline modifiée d'origine bactérienne selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est constituée par la SEQ ID N°1 ou ses variants.
10. Séquences nucléiques codant pour une phosphatase alcaline selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.
11. Plasmide recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour une phosphatase alcaline selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et apte à exprimer ladite phosphatase alcaline dans une cellule hôte convenable.
12. Cellule hôte, transformée par un plasmide selon la revendication 11.
13. Procédé de sélection d'une phosphatase alcaline bactérienne modifiée, possédant à la fois une activité catalytique augmentée par rapport à celle de la phosphatase alcaline bactérienne native et une stabilité thermique de l'ordre de celle de ladite phosphatase alcaline native, caractérisé en ce qu'il comprend :
 - i) la préparation d'une phosphatase alcaline chimère inactive comprenant l'introduction dans la séquence codant pour la BAP, d'au moins deux codons codant pour deux résidus d'acides du site actif d'une phosphatase alcaline de mammifère ;
 - ii) la réalisation d'une mutagenèse aléatoire ou dirigée sur le gène codant pour cette phosphatase alcaline chimère inactive ;
 - iii) l'expression des phosphatases alcalines obtenues en ii) ;
 - iv) la sélection des clones bactériens exprimant une phosphatase alcaline dont l'activité enzymatique est restaurée ; et
 - v) le séquençage des phosphatases alcalines mutées ainsi obtenues et la sélection de la/les mutations de compatibilité à introduire dans une phosphatase alcaline bactérienne sauvage.
14. Procédé de sélection selon la revendication 13, caractérisé en ce que les mutations introduites à l'étape i) portent au moins sur les résidus d'acide en position 153, 328, 329 et 330 de l'enzyme bactérienne.
15. Procédé de sélection selon la revendication 13 ou la revendication 14, caractérisé en ce que la mutation introduite à l'étape ii) porte au moins sur les résidus d'acides en position 329 et/ou 330 de l'enzyme bactérienne et consiste notamment en la substitution de His en 330 par Asn, Ala ou Leu ou en la substitution en position 329 de Gly par Ala.
16. Procédé de sélection selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que les mutations introduites à l'étape i) portent sur l'ensemble des résidus suivants :

résidu 153 : remplacement de Asp par His,
résidu 328 : remplacement de Lys par His,
résidu 329 : remplacement de Gln par Gly,
résidu 330 : remplacement de Asp par His.
17. Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend une phosphatase alcaline selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.
18. Phosphatase alcaline chimère constituée d'une phosphatase alcaline bactérienne comprenant au moins 2 résidus d'acide du site actif d'une phosphatase alcaline de mammifère et biologiquement inactive.

- 19.** Phosphatase alcaline chimère selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle correspond au mutant D153H/K328H/Q329G/D330H.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

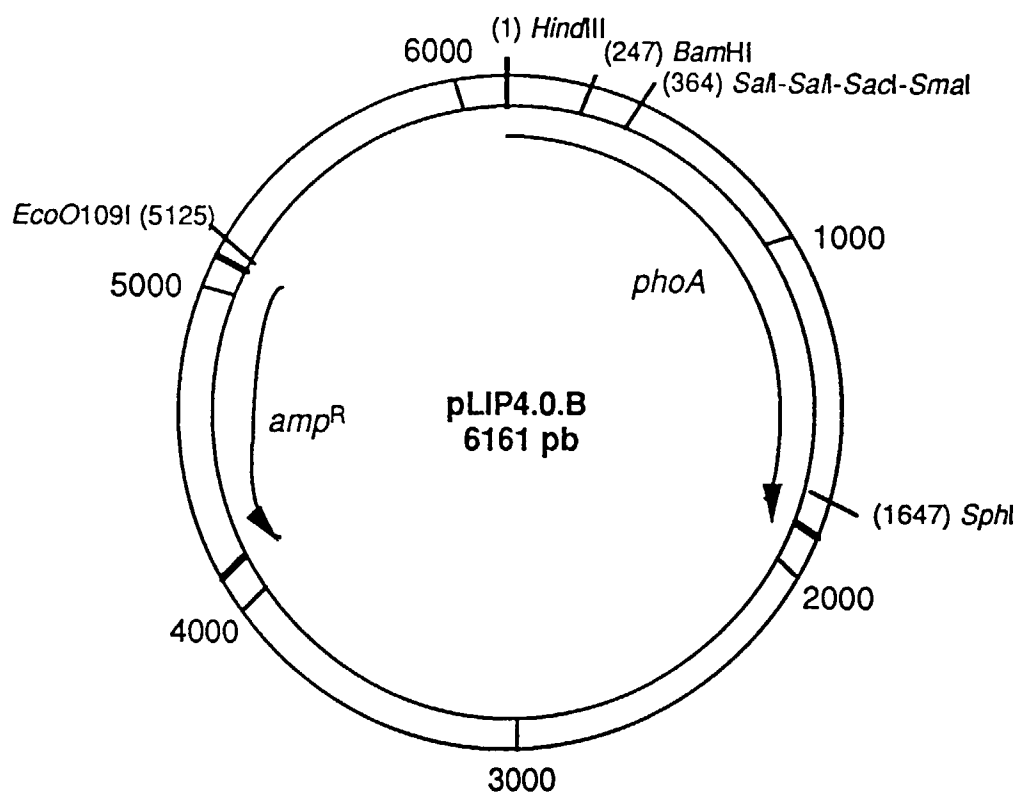


FIGURE 1

Séquence nucléotidique du vecteur pLIP4.0.B : la séquence codante du gène phoA est en gras.

AAGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCGGTTGATTGATCAGGT
 AGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCCTGACGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTA
 AAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGA
 CTTATAGTCGCTTTGTTTGGATCCTTTAATGTATTGTACATGGAGAAAATAAAGT**GAAACAAAGCACTATTG**
CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCCGGACACCAGAAATGCCCGTCGA
CTTCAGTCGACGAGCTCCCGGGTCTTGAAAACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCCGGC
GGTGCTCGCCGTTTAAACGGGTGATCAGACTGCCGCTCTGCGTGATTCTCTTAGCGATAAACCTGCAA
AAAATATTATTTTGTGATTGGCGATGGGATGGGGGACTCGGAAATTACTGCCGCACGTAATTATGC
CGAAGGTGCGGGCGGCTTTTTTAAAGGTATAGATGCCTTACCGCTTACCGGGCAATACACTCACTAT
GCGCTGAATAAAAAAACCGGCAAACCGGACTACGTCACCGACTCGGCTGCATCAGCAACCGCCTGGT
CAACCGGTGTCAAACCTATAACGGCGCGCTGGGCGTCGATATTCACGAAAAAGATCACCCAACGAT
TCTGGAATGGCAAAAGCCGAGGTCTGGCGACCGGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTGCAGGATGCC
ACGCCCCTGCGCTGGTGGCACATGTGACCTCGCGCAAATGCTACGGTCCGAGCGCGACCAGTGAAA
AATGTCCGGGTAACGCTCTGAAAAAGGCGGAAAGGATCGATTACCGAACAGCTGCTTAACGCTCG
TGCCGACGTTACGCTTGGCGGCGCGCAAAACCTTTGCTGAAACGGCAACCGCTGGTGAATGGCAG
GGAAAAACGCTGCGTGAACAGGCACAGGCGCGTGGTTATCAGTTGGTGAGCGATGCTGCCTCACTGA
ATTCCGGTGACGGAAGCGAATCAGCAAAAACCCCTGCTTGGCCTGTTTGCTGACGGCAATATGCCAGT
GCGCTGGCTAGGACCGAAAGCAACGTACCATGGCAATATCGATAAGCCCGCAGTCACCTGTACGCCA
AATCCGCAACGTAATGACAGTGTACCAACCTGGCGCAGATGACCGACAAAGCCATTGAATTGTTGA
GTAAAAATGAGAAAGGCTTTTTCTGCAAGTTGAAGGTGCGTCAATCGATAAACAGGATCATGCTGC
GAATCCTTGTGGGCAAATTGGCGAGACGGTCGATCTCGATGAAGCCGTACAACGGGCGCTGGAATTC
GCTAAAAAGGAGGGTAACACGCTGGTCATAGTCACCGCTGATCACGCCACGCCAGCCAGATTGTTG
CGCCGGATACCAAAGCTCCGGGCTCACCCAGGCGCTAAATACCAAAGATGGCGCAGTGATGGTGAT
GAGTTACGGGAACTCCGAAGAGGATTCACAAGAACATACCGGCAGTCAGTTGCGTATTGCGGCGTAT
GGCCCGCATGCCGCCAATGTTGTTGGACTGACCGACCAGACCGATCTCTTCTACACCATGAAAGCCG
CTCTGGGGCTGAAATAAACCGCGCCCGGCACTGAATTTTCGCTGCCGGGTGGTTTTTTTGCTGTTAGCAACCA
GACTTAATGGCAGATCACGGGCGCATACGCTCATGGTTAAAAACATGAAGAGGGATGGTGCTATGAAAAATAACATTA
CTGGTTACCTTGCTTTTCGGTCTGGTTTTTTTAACCACCGTCGGCGCTGCCGAGAGAACTTTAACCCCAACAAC

FIGURE 2.1

AGCGTATGACCTCCTGTAATCAGCAGGCGACGGCGCAGGCGTTGAAAGGGGATGCTCGTAAGACCTACATGAGTGA
TTGCCTGAAGAACAGCAAGTCTGCGCCTGGCGAAAAAGTTTGACGCCACAGCAGCAAAAGATGCGCGAATGCAAT
AATCAAGCAACACAACAATCTCTGAAAGGTGATGATCGTAATAAGTTTATGAGTGCCTGCCTCAAGAAAGCCGCT
GATACCTGATAGTGCTAACGGGTGAGCTACGAAAATGGCTCACCCGAAATATCATACTTCTGCCTTTAGCTCCGTC
TCTATAATTTGGGAAAAATTGTTTCTGAATGTTCCCAAAAATAATGAATGATGAAAACTTTTTCAAAAAGCGGCGG
CGCACGGGGAGGAACCTCCTTTAACTCCTCAAAACGAACATCAGCGGTCCGGGCTGCGCTTCGCCCCGTGCGCTCAG
ACTACCCCGTGCGGTTGGCCTGGCTGGCATGTTCTTACCGATTGCTTCAACGCTGGTTTCACACCCGCCGCCGGG
TGGTGGTGGCTGGTGTGGTGGCTGGGCGTTCGTCTGGCCGCATTTAGCCTGGCAGATAGCGAGCAGGGCCGTCG
ATCCGCTTAGCCGGGAAATTTACAACCTAAAAACCGATGCAGTATTAGCGGGAATGTGGGTAGGCGTAATGGGCGT
AAACGTGCTGCCTTCCACCGCGATGTTGATGATTATGTGTCTGAATTTGATGGGGGCAGGCGGCCCCCGTCTGTTT
GTCGCGGGTCTGGTGTGATGGTGGTTTCTGCCTTGTCACCCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCA
TAACACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTCGAAT
GTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTGTCTGAGTTGAAGGATCAGATC
ACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAAGTTCAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACA
AAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTACGGCTGGTATGAGTCAGCAAC
ACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCTAGCGGAGTGATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTC
GTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCC
GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCGTTGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAG
ATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC
AGGCGTTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTTCTGCCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTT
ATGGCCGCGTTTTGTCTCATTCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCA
CGAACCCCCCGTTCACTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAGACATGCA
AAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAA
ACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAA
CCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCA
AGAAGATCATCTTATTAAGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTA
TCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCATCCATAGT
TGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG

FIGURE 2.2

CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTC
 CTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAG
 TTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
 GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGA
 TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCAT
 GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG
 AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
 AACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
 CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
 AAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGG
 GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
 CCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATGCACGAG
 GCCCTTTCGTCTTCAAGAATTTTATAAACCGTGAGCGGGCAATACTGAGCTGATGAGCAATTTCCGTTGCACCAG
 TGCCCTTCTGATGAAGCGTCAGCACGACGTTCTGTCCACGGTACGCCTGCGGCCAAATTTGATTCTTTTCAGCTT
 TGCTTCTGTGCGCCCTCATTCGTGCGCTCTAGGATCCTCCGGCGTTTCAGCCTGTGCCACAGCCGACAGGATGGTG
 ACCACCATTTGCCCATATCACCGTCGGTACTGATCCCGTCGTCAATAAACCGAACCGCTACACCCTGAGCATCAA
 ACTCTTTTATCAGTTGGATCATGTGCGCGTGTGCGGCCAAGACGGTCGAGCTTCTTCACCAGAATGACATCACCT
 TCCTCCACCTTCATCCTCAGCAAATCCAGCCCTTCCCGATCTGTTGAACTGCCGGATGCCTTGTCGGTAAAGATGC
 GGTTAGCTTTTACCCCTGCATCTTTGAGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCC
 TGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGG
 TGATTTTGAACTTTGTCTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGC
 AAAAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAA
 CCAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTATATCAGGATTATCAATACCATA
 TTTTGTAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTAT
 CGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAGTG
 AGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAATTCTG

FIGURE 2.3

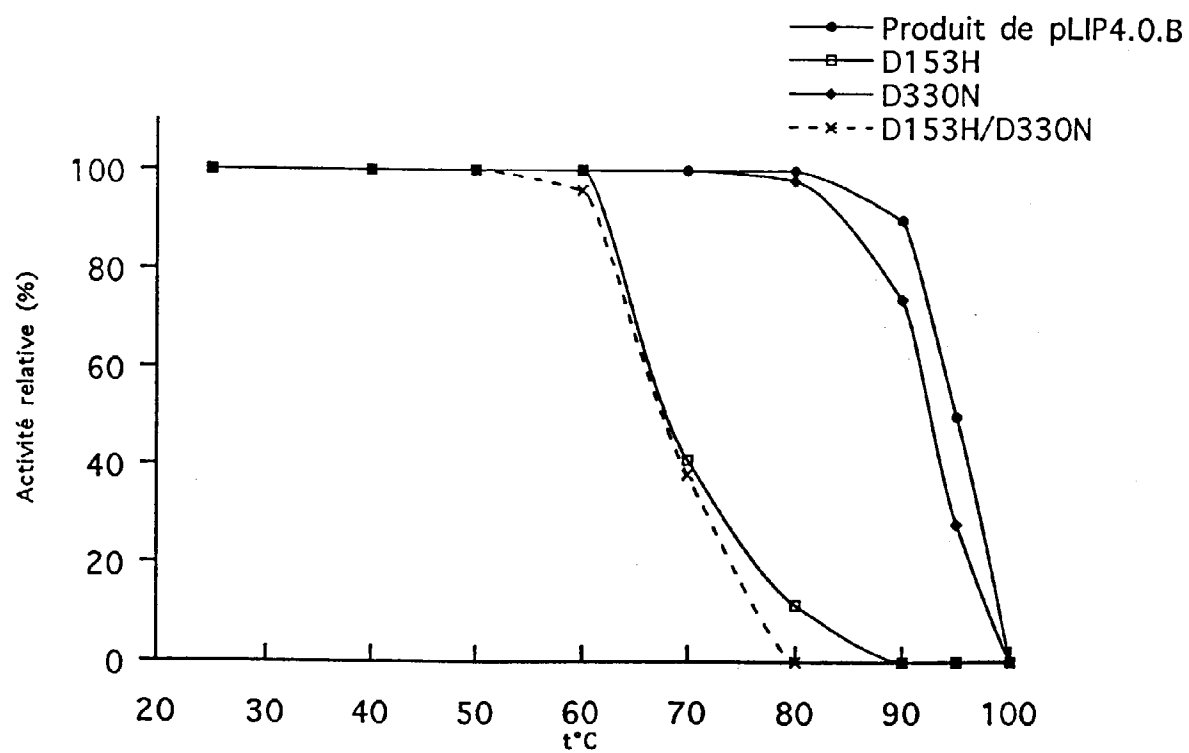
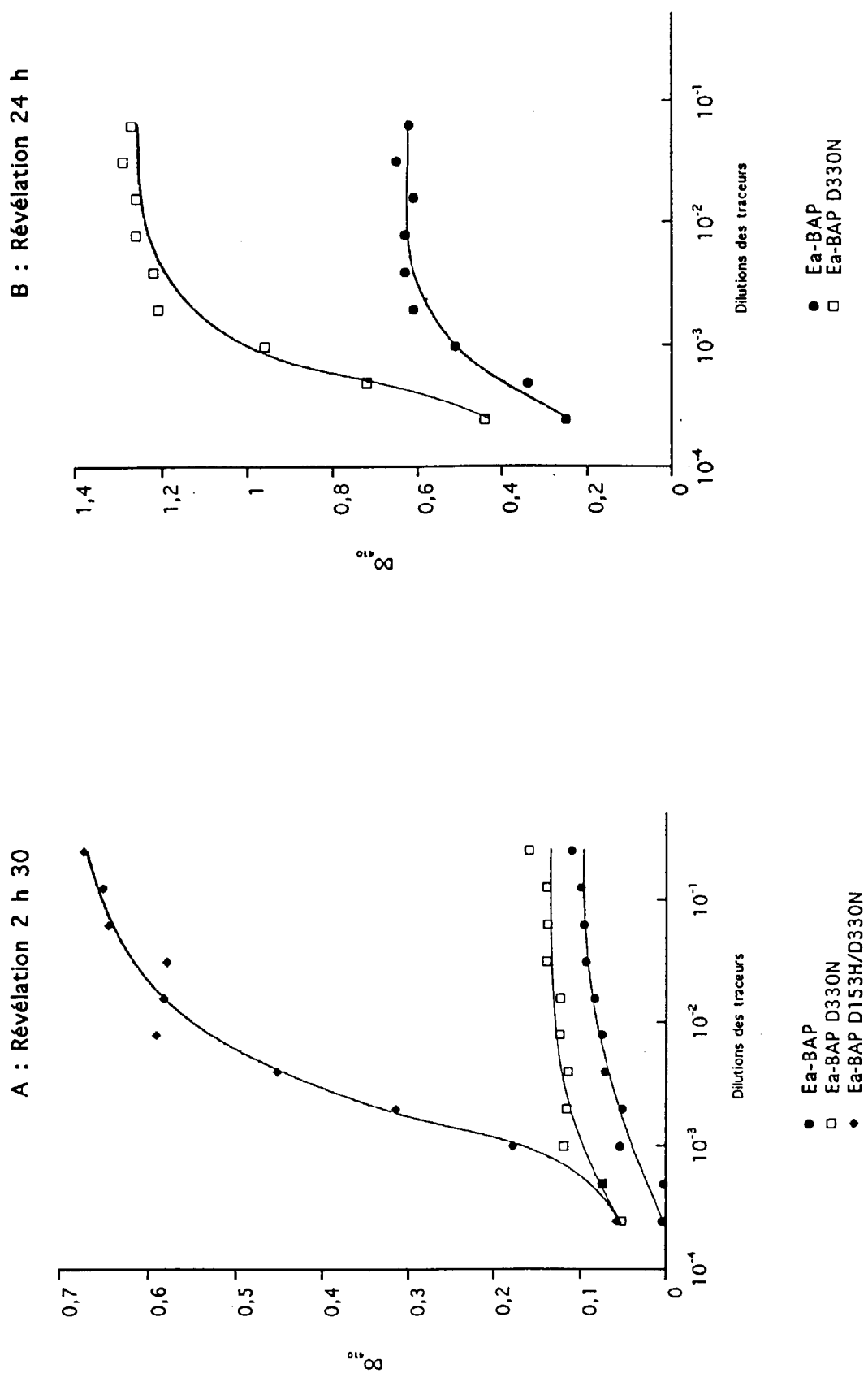


FIGURE 3

**FIGURE 4**

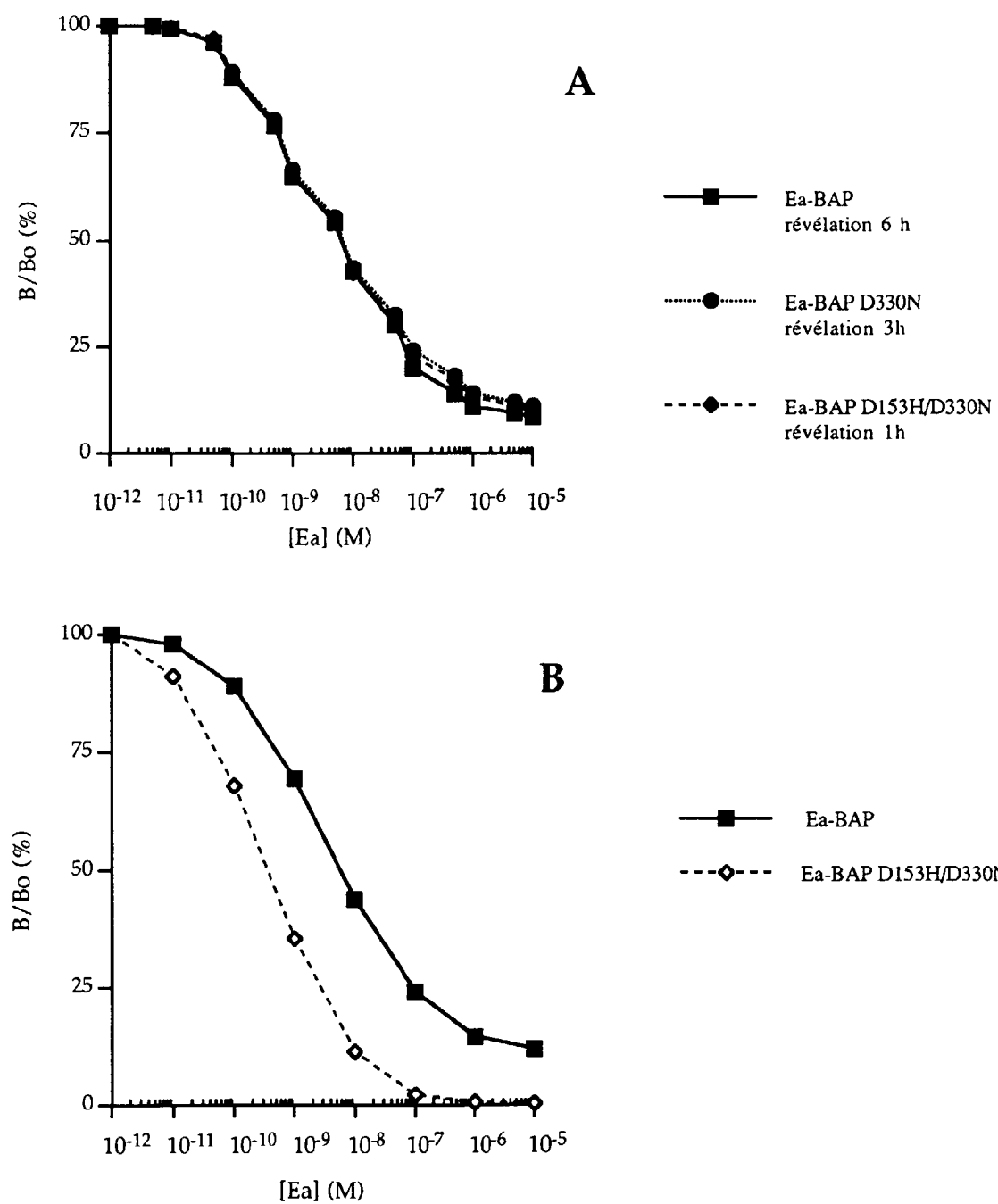


FIGURE 5

```

tcgacttcgttaaccagcacctgtgcggtcccacctgggtggaagcttctgtatctggtgtggtggtggtggtt
    gaagcaattggtcgtggacacgcccagggtggaccaccttcgaaacatagaccacacgacctcgacccgaa

cttctacacccgaagacgctcgtgaagcgaagatctgcaagtggccagggtggaactgggaggggg
gaagatgtgggcttctgcgagcacttcgcctctctagacgttcacccggtccaccttgacccgcccccc

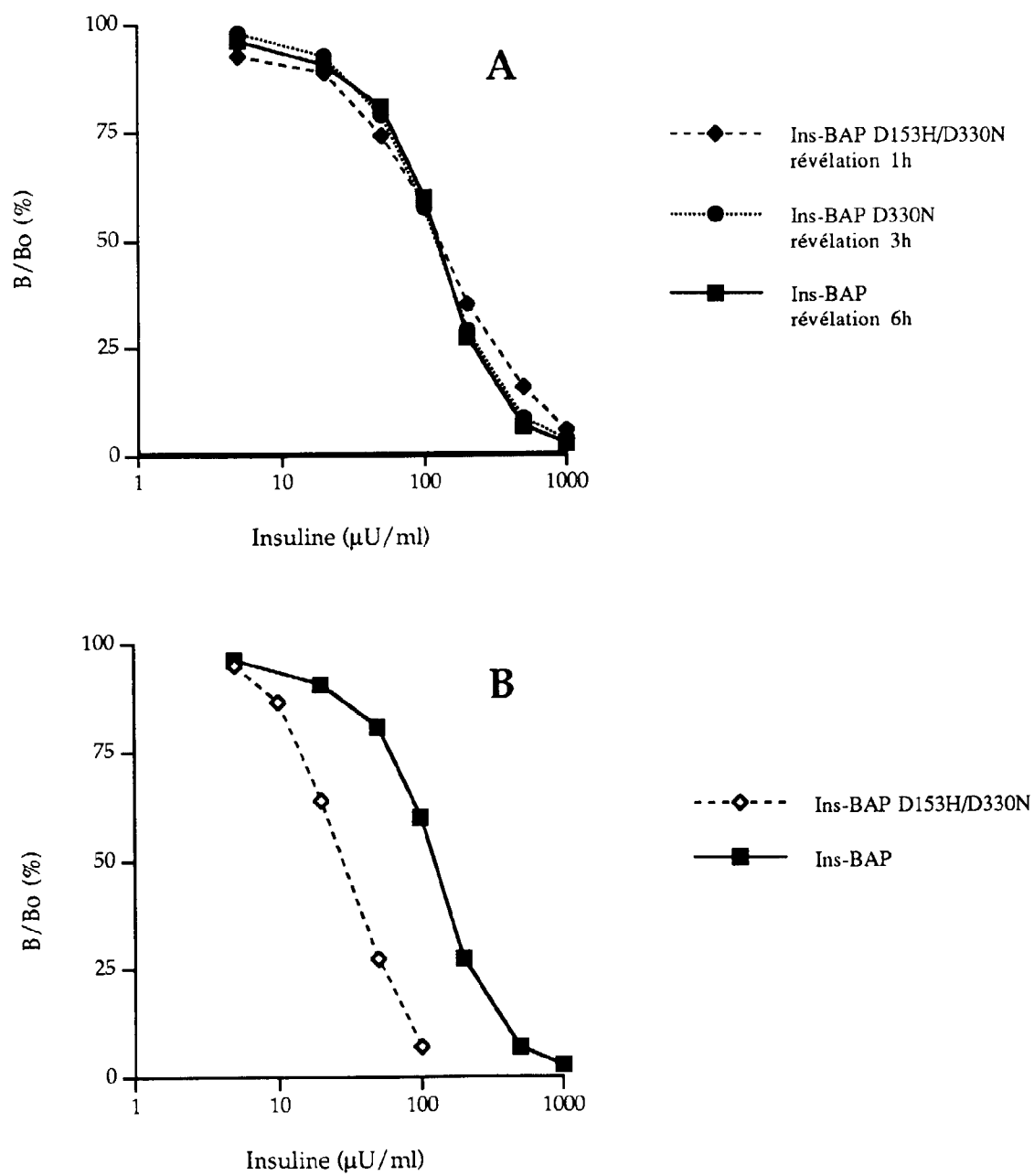
cccgggcgccggcagcctgcaaccgctggcgctggaggcagcctccagaagcgtggcattgtggagc
ggggccgcccgtcggacgttggcgacccgcgacctcccgctcggagggtcttcgcaaccgtaacacctcg

agtgtttagtagtatctgcagcctgtaccagctggagaattactgcaacggagct
tcacaacatgatcatagacgtcggacatggtcgacctcttaataatgacgttgcc

```

Le peptide C est représenté en gras; les bases ajoutées à la séquence de la proinsuline qui permettent à la fois l'insertion dans le vecteur pLIP5 et la restauration du cadre de lecture du gène *phoA* sont en italiques.

FIGURE 6

FIGURE 7



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 96 40 1419

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
D,A	BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1993, EASTON, PA US, pages 1601-1609, XP002000142 C.M.L. JANEWAY ET AL: "Magnesium in the active site of Escherichia coli Alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis" * le document en entier * ---	1-7, 10-12, 18,19	C12N15/55 C12N9/16 C12N1/21 C12N15/10
D,A	WO-A-94 01531 (ABBOT LABORATORIES) * le document en entier * ---	1-7, 10-12	
D,A	PROTEIN ENGINEERING, vol. 5, no. 3, 1992, ENGLAND GB, pages 273-278, XP002000143 D. GILLET ET AL: "Insertion of a disulfide-containing neurotoxin into E. coli alkaline phosphatase : the hybrid retains both biological activities" * abrégé; figure 1 * ---	1,8	
A,D	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 12, no. 3, 1994, pages 351-357, XP000566389 J.E. MURPHY ET AL: "Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases" * le document en entier * -----	1-7, 10-12, 18,19	C12N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 30 Octobre 1996	Examineur Le Cornec, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03/92 (P04C02)